

SKRINING TOKSIN ASAM OKADAİK PADA KEKERANGAN DAN IKAN MENGGUNAKAN IMMUNOASSAY

Angela Mariana Lusiastuti^{*)}

ABSTRAK

Peningkatan insidensi *blooming* fitoplankton yang menyebabkan pengeluaran toksinnya ke dalam rantai makanan memerlukan metode diagnosa yang dapat mendeteksi toksin dengan cepat dan terpercaya. Deteksi menggunakan *Competitive Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) dilakukan untuk kuantifikasi asam okadaik pada ekstrak kekerangan dan ikan. Untuk membandingkan kuantitas asam okadaik menggunakan metode ELISA, digunakan 50 sampel kekerangan dan 50 sampel ikan serta diekstraksi dengan pelarut yang berbeda. Hasilnya, deteksi limit pada sampel menggunakan *DSP Quick Check Test Kit* adalah 0,2 µg/g dan *inhibition concentration* 50 (IC 50) dari asam okadaik yang diperoleh adalah 7,75 ng/mL.

ABSTRACT: *Screening for okadaic acid toxin from shellfish and fish by immunoassay. By: Angela Mariana Lusiastuti*

Increasing incidences of phytoplankton blooms with the potential danger of toxin release into the food chain have necessitated for diagnostic methods that can detect toxins quickly and reliably. A competitive enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA) was developed to quantitate okadaic acid in shellfish and fish extracts. To compare the quantity of of okadaic acid from this method, 50 shellfish and 50 fish extracts were analyzed and extracted with different solution. The result, limit detection of sample using DSP Quick Check Test Kit is 0.2 µg/g and the inhibition concentration 50 of okadaic acid is 7.75 ng/mL.

KEYWORDS: *toxin, okadaic acid, ELISA*

PENDAHULUAN

Asam okadaik (AO), polietir toksik C₃₈^{*}, merupakan komponen utama penyebab diare akibat keracunan mengkonsumsi kekerangan. Kerang beracun tersebut terkontaminasi dinoflagellata (*Dinophysis* sp. dan *Prorocentrum* sp.) melalui sistem makannya yang bersifat *filter feeder* (Shumway, 1990; Draisci *et al.*, 1999).

Keracunan kekerangan yang bersifat diaretik (*Diarrhetic Shellfish Poisoning/DSP*), sebenarnya tidak bersifat fatal bagi konsumen, tetapi karena morbiditasnya yang tinggi dan kejadiannya yang dapat dijumpai hampir di seluruh belahan dunia menyebabkan ancaman yang serius bagi industri perikanan khususnya kekerangan dan ancaman bagi kesehatan

masyarakat pada umumnya (Fisheries Statistics of Indonesia, 1998).

Asam okadaik merupakan inhibitor potensial terhadap protein fosfatase serine (PP1) dan protein fosfatase treonin (PP2A), dengan mengikat PP1 dan PP2A tidak terjadi defosforilasi dan menyebabkan hiperfosforilasi. Defosforilasi dikenal sebagai mekanisme kunci dalam aktivitas biologis. Kondisi hiperfosforilasi dapat menyebabkan kondisi patologis yaitu seperti memicu terjadinya tumor (Fujiki & Suganuma, 1993). Lebih lanjut, Fujiki & Suganuma (1993) menyatakan bahwa asam okadaik berperan sebagai promotor timbulnya kanker pada manusia dan hasil penelitiannya menggunakan tikus yang diberi asam okadaik dalam jangka waktu lama (*chronic feeding*) menunjukkan

^{*)} Peneliti pada Pusat Riset Perikanan Budidaya, Jakarta

bahwa toksin ini merupakan promotor kanker yang sangat kuat.

Metode yang umum digunakan untuk mendeteksi toksin asam okadaik adalah *mouse bioassay*, tetapi spesifisitas metode ini rendah karena setiap bahan yang bersifat toksik akan mempengaruhi hasil yang diperoleh (Usleber *et al.*, 1991; Draisci *et al.*, 1999).

DSP Check-Quick Test Kit (Rougier Bio-Tech) merupakan tes kualitatif untuk tes skrining secara cepat pada inspeksi rutin pada industri kekerangan dan monitoring plankton pada perairan. Kriteria metode *skrining* yang diminta oleh pasar adalah mudah penggunaan dan interpretasinya, cepat, murah, kemampuan membedakan secara akurat antara ikan atau kerang toksik dan yang tidak toksik, dan kemampuan mengkonfirmasi toksin atau toksisitas produk yang diuji. Menurut Garthwaite (2000), *test kit* komersial ELISA untuk asam okadaik sudah banyak tersedia di pasaran. *Test kit* tersebut umumnya mendeteksi asam okadaik terutama pada organ hepatopankreas kekerangan, tetapi sensitivitasnya menurun jika digunakan untuk pemeriksaan kekerangan utuh (*whole shellfish*) (Usleber *et al.*, 2001).

Penelitian ini bertujuan mengetahui kemampuan uji (*diagnosability*) *DSP Check-Quick Test Kit* pada beberapa jenis sampel kekerangan dan ikan dan mengetahui metode ekstraksi sampel yang terbaik untuk kuantifikasi toksin asam okadaik secara maksimal.

BAHAN DAN METODE

Sampel

Penelitian dilakukan di Laboratorium Higiene Susu *Justus Liebig University*, Giessen, Jerman pada bulan Agustus sampai dengan Desember 2002. Bahan uji yang digunakan untuk penelitian adalah kekerangan jenis *Anadara granosa*, *Anadara inflata*, *Mytilus viridis*, dan *Meretrix meretrix*. Jenis sampel ikan yang digunakan adalah *Epinephelus* spp., *Lates calcarifer*, *Caesio* spp., *Polynemus* spp., dan *Mugil* spp. Sampel yang digunakan sebanyak 50 sampel kekerangan diekstrak dari daging seluruh badan (*whole body*) dan 50 sampel ikan yang diekstrak dari daging dan telur ikan.

Ekstraksi Toksin

Ekstraksi toksin menggunakan dua jenis pelarut yaitu metanol dan heksan. Sampel

kekerangan dan ikan sebanyak 100 mg dilarutkan dengan 1 mL metanol maupun heksan kemudian divortex selama 2 menit, selanjutnya disentrifus 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatannya diambil dan ditambahkan akuades (1:1) dan dilanjutkan untuk pemeriksaan ELISA.

ELISA

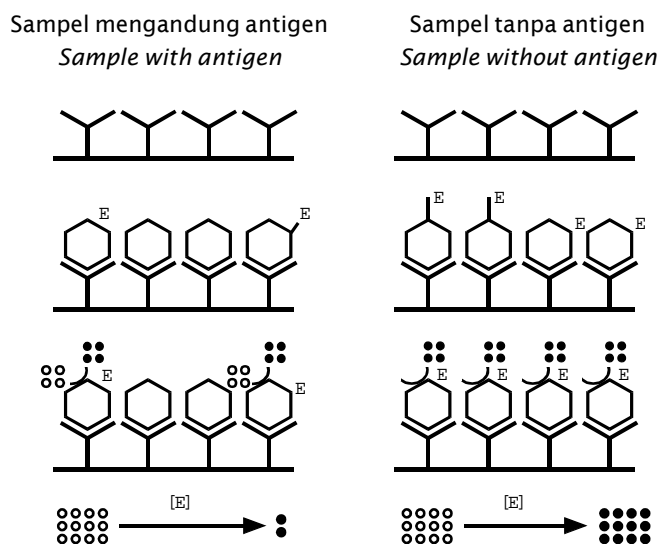
Larutan standar dan larutan sampel masing-masing 50 μ L dimasukkan dalam lubang lempeng mikro titer, kemudian ditambahkan 50 μ L larutan antibodi konjugat enzim dan diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Setelah itu dicuci empat kali dengan larutan pencuci dan segera dikeringkan. Tambahkan larutan kromogen 50 μ L dan dibiarkan selama 6 menit dalam suhu ruang dan dihindarkan dari cahaya. Untuk menghentikan reaksi, ditambahkan 50 μ L *stopping reagent* dan dibaca dengan menggunakan *ELISA reader* untuk mengetahui ada tidaknya toksin dan berapa konsentrasinya.

HASIL DAN BAHASAN

DSP Check-Quick Test Kit berkonfigurasi ELISA *direct-competitive* (kompetitif langsung) menggunakan antibodi monoklonal sebagai antibodi penangkap dan antibodi *anti-mouse* yang dikopel dengan peroksidase sebagai antibodi detektor (Gambar 1).

Pada Tabel 1 diperlihatkan hasil pembacaan ELISA dari asam okadaik dari ekstraksi dengan menggunakan dua jenis pelarut yaitu metanol dan heksan.

Antibodi monoklonal mempunyai sifat yang lebih spesifik dibandingkan poliklonal, hal ini terlihat dari hasil ekstraksi sampel yang menggunakan dua jenis pelarut seperti disajikan pada Tabel 1. Metanol dan heksan memberikan hasil asam okadaik yang berbeda, yaitu 449 ng/mL dan 114,85 ng/mL. Berdasarkan aktivitas eluotropik (kekuatan mengelusi) maka metanol mempunyai daya elusi yang lebih kuat dibandingkan dengan heksan, sehingga asam okadaik yang terelusi mempunyai epitop yang berbeda. Daya mengelusi toksin dari larutan tergantung sifat kepolaran larutan tersebut. Makin polar larutan tersebut, makin mudah untuk mengelusi toksin. Kemungkinan yang terelusi oleh pelarut heksan adalah isomer asam okadaik yang mengalami perubahan konformasi protein dan tidak dikenali oleh antibodi monoklonal asam okadaik.



Gambar 1. Konfigurasi ELISA kompetitif langsung
Figure 1. Direct competitive ELISA configuration

Tabel 1. Asam okadaik dari hasil ELISA dengan ekstraksi dari dua jenis pelarut

Table1. The result of okadaic acid from ELISA with two kinds of extraction solvent

Pelarut Solvent	Asam okadaik Okadaic acid (ng/mL)
Metanol (Methanol)	449
Heksan (Hexan)	114.85

Pemeriksaan sampel dengan *DSP Check-Quick Test Kit* diperoleh hasil sebagai berikut; untuk kekerangan positif asam okadaik pada dua sampel dengan kisaran 200 ppb sampai 2 mg/L, sedangkan pada sampel ikan diperoleh dua sampel positif pada organ hati dan telur dengan konsentrasi asam okadaik berkisar antara 200 ppb sampai lebih dari 2 mg/L.

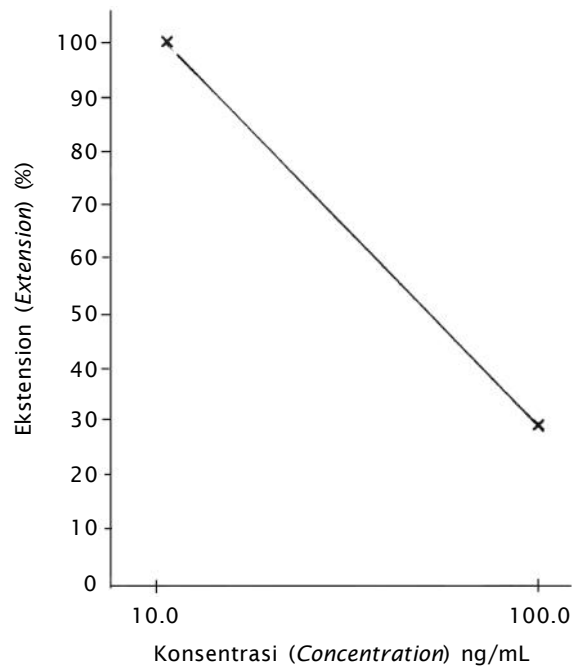
DSP Check-Quick Test Kit dapat ditingkatkan akurasi dan presisinya dengan melakukan modifikasi pada kurva standar sehingga dapat meningkatkan sensitivitasnya menjadi tes kuantitatif untuk memperoleh batas ambang yang lebih akurat. Hasil ini dilakukan melalui pengenceran larutan standar asam okadaik dengan konsentrasi 2,5; 5; 10; 25; 50; dan 100 ng/mL sehingga diperoleh kurva standar yang sigmoid (Gambar 2 dan 3).

Pada Gambar 2 terlihat kurva regresi linier dengan kisaran 10 dan 100 ng/mL, dengan *extinction* rata-rata 0,578 dan 0,171.

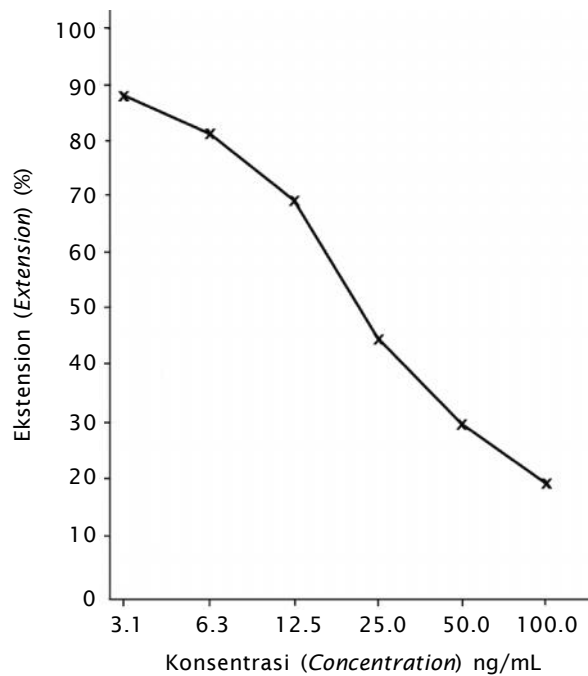
Sedangkan pada Gambar 3 setelah dilakukan pengenceran larutan standar maka diperoleh kurva berbentuk *cubic spline* yang memungkinkan diperoleh hasil yang lebih akurat. Konsentrasi larutan standar yaitu berkisar antara 3,1 sampai 100 ng/mL dan *extinction* 0,877 sampai 0,197.

Maka dengan memodifikasi kurva standar (dalam µg/100g) diperoleh hasil sebagai berikut:

DSP Check-Quick Test Kit digunakan sebagai uji semi-kuantitatif yang ditujukan untuk uji tapis (*screening test*) toksin asam okadaik dengan kisaran deteksi 10—100 ppb.



Gambar 2. Kurva linier dari kurva standar dengan kisaran 10 dan 100 ng/mL
 Figure 2. Linier curve of standard curve at 10 and 100 ng/mL



Gambar 3. Kurva *cubic spline* dari kurva standar setelah dilakukan modifikasi
 Figure 3. *Cubic spline* curve of standard curve after modified

Tabel 2. Perbedaan hasil asam okadaik dari *DSP Check-Quick Test Kit* dan modifikasi standar

Table 2. The result differentiation of okadaic acid between *DSP Check-Quick Test Kit* and standar modification

Sampel positif <i>Positive sample</i>	Tes DSP secara cepat <i>DSP check-quick test kit</i>	Modifikasi kurva standar <i>Standar curve modification (µg/100g)</i>
Kerang 1 <i>Shellfish 1</i>	200 ppb--2 mg/L	0.01--0.04 µg
Kerang 2 <i>Shellfish 2</i>	200 ppb--2 mg/L	0.025 µg
Hati ikan <i>Fish liver</i>	> 2 mg/L	0.5 µg
Telur ikan <i>Fish egg</i>	200 ppb--2 mg/L	0.3--0.5 µg

Modifikasi yang dilakukan ternyata dapat memperbaiki sensitivitasnya dengan memperoleh *inhibition concentration* 50 sebesar 7,75 ng/mL; sedangkan limit deteksi toksin pada daging kekerangan adalah 0,2 µg/g.

Toksin alga dapat masuk ke dalam rantai makanan dan merupakan aspek penting jika makanan dikonsumsi oleh manusia. Ikan yang termasuk anggota dalam suatu rantai makanan ternyata diketahui mengandung asam okadaik di dalam hati dan telurnya. Dibandingkan dengan kekerangan, ikan lebih banyak dikonsumsi manusia sehingga hal ini perlu mendapat perhatian. Saat ini setiap negara menggunakan *level* toleransi untuk asam okadaik adalah 16--20 µg/100 g, sehingga hasil seperti tertera pada Tabel 2 masih jauh di bawah *level* toleransi sehingga masih tergolong aman untuk dikonsumsi.

KESIMPULAN

1. Metode ekstraksi menggunakan metanol baik digunakan untuk ekstraksi asam okadaik.
2. *DSP Check Test Kit* ELISA dapat dikembangkan menjadi tes rutin secara kuantitatif.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Prof. Ewald Usleber dan Dr. Valeriu Curtui atas nasehat dan bimbingannya selama penelitian di Liebig University, Giessen Germany. Terima kasih juga kepada doktorat Caroline Seidler dan tehni Cornelia Eichmann atas bantuan selama bekerja di laboratorium. Penelitian ini dibiayai oleh

Deutscher Akademischer Austauschdienst Germany (DAAD).

DAFTAR PUSTAKA

- Draisci, R, D.W. Cook, and S.E. Shumway. 1999. New approach to the direct detection of known and new diarrhoeic shellfish toxins in mussels and phytoplankton by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chronatogr.* 847: 213--221.
- Fisheries Statistics of Indonesia. 1998. Marine Fishery. Fisheries and Marine Department, Jakarta. 75 pp.
- Fujiki, H. and M. Suganuma. 1993. Tumor promotion by inhibitors of protein phosphatase 1 and 2A: The okadaic acid class of compounds. *Adv Cancer Res.* 61: 143--194.
- Garthwaite, I. 2000. Keeping shellfish to eat: a brief review of shellfish toxins and methods for their detection. *Trends Food Sci Tech.* 11: 235--244.
- Shumway, S.E. 1990. A Review of The Effects of Algal Blooms on Shellfish and Aquaculture. *J. World Aquacult. Soc.* 21: 65--104.
- Usleber, E, R. Dietrich, C. Burk, E. Schneider, and E. Martlbauer. 1991. Direct Enzyme Immunoassay in Microtitration Plate and Test Strip Format for The Detection of Saxitoxin in Shellfish. *Lett. in Appl. Microbiol.* 13: 275--277.
- Usleber, E., R. Dietrich, C. Burk, E. Schneider, and E. Martlbauer. 2001. Immunoassay Methods for Paralytic Shellfish Poisoning Toxins. *JAOAC.* 84: 1,649--1,656.